

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



#6  
JC558 U.S. PRO  
09/303232  
84/30/99

## Bescheinigung

Die Bayer Aktiengesellschaft in Leverkusen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Nukleinsäuren, die für Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten von Insekten kodieren"

am 4. Mai 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 4. März 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 19 829.9

Hiebinger

5

Nukleinsäuren, die für Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten von Insekten kodieren

Die Erfindung betrifft insbesondere Nukleinsäuren, die für Acetylcholinrezeptor-  
10 Untereinheiten von Insekten kodieren.

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die eine  
Rolle bei der Neurotransmission im Tierreich spielen. Die Bindung von Acetylcholin  
oder anderen Agonisten an den Rezeptor verursacht eine vorübergehende Öffnung  
15 des Kanals und gestattet den Durchstrom von Kationen. Man nimmt an, daß ein  
Rezeptor aus fünf Untereinheiten besteht, die sich um eine Pore gruppieren. Jede  
dieser Untereinheiten ist ein Protein, das aus einem extrazellulären N-terminalen Teil  
besteht, gefolgt von drei Transmembranregionen, einem intrazellulären Teil, sowie  
einer vierten Transmembranregion und einem kurzen extrazellulären C-terminalen  
20 Teil (Changeux et al. 1992).

Acetylcholinrezeptoren sind vor allem in Wirbeltieren gut untersucht. Anhand ihrer  
anatomischen Lokalisierung und ihrer funktionellen Eigenschaften (Leitungseigen-  
schaften des Kanals, Desensibilisierung, Sensitivität gegenüber Agonisten und  
25 Antagonisten, sowie gegenüber Toxinen wie z.B.  $\alpha$ -Bungarotoxin) lassen sich hier  
drei Gruppen unterscheiden. Die Einteilung korreliert mit der molekularen Zusam-  
mensetzung der Rezeptoren. Es gibt heterooligomere Rezeptoren mit der Unter-  
einheitenzusammensetzung  $\alpha_2\beta\gamma\delta$ , die im Muskel vorkommen (Noda et al. 1982,  
Claudio et al. 1983, Devillers-Thiery et al. 1983, Noda et al. 1983a, b), heterooligo-  
30 märe Rezeptoren, die Untereinheiten aus der Gruppe  $\alpha 2 - \alpha 6$  und  $\beta 2 - \beta 4$  enthalten,  
und die im Nervensystem vorkommen (Wada et al. 1988, Schoepfer et al. 1990,  
Cockcroft et al. 1991, Heinemann et al. 1997), sowie homooligomere Rezeptoren, die  
Untereinheiten aus der Gruppe  $\alpha 7 - \alpha 9$  enthalten, und die ebenfalls im Nervensystem  
vorkommen (Lindstrom et al. 1997, Elgoyen et al. 1997). Diese Einteilung wird  
35 auch durch eine Betrachtung der Verwandschaft der Gensequenzen der

5

verschiedenen Untereinheiten gestützt. Typischerweise sind die Sequenzen funktionell homologer Untereinheiten verschiedener Spezies ähnlicher als Sequenzen von Untereinheiten aus verschiedenen Gruppen, aber der gleichen Spezies. So weist z.B. die muskuläre  $\alpha$ -Untereinheit der Ratte 78 % identische und 84 % ähnliche 10 Aminosäuren auf mit der des elektrischen Rochens *Torpedo californica*, aber nur 48 % Identität und 59 % Ähnlichkeit mit der  $\alpha 2$ -Untereinheit (heterooligomer, neuronal) der Ratte, und 36 % Identität und 45 % Ähnlichkeit mit der  $\alpha 7$ -Untereinheit (homooligomer, neuronal) der Ratte. Weiterhin sind die Gensequenzen aller bekannten Acetylcholinrezeptor-Untereinheitenen nicht nur untereinander in gewissem Maße ähnlich, sondern auch mit denen einiger anderer ligandengesteuerter 15 Ionenkanäle (z.B. den Serotoninrezeptoren vom Typ 5HT<sub>3</sub>, den GABA-gesteuerten Chloridkanälen, den Glycin-gesteuerten Chloridkanälen). Man geht daher davon aus, daß alle diese Rezeptoren von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen und ordnet sie in eine Supergenfamilie ein (Ortells et al. 1995).

20

In Insekten ist Acetylcholin der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter des zentralen Nervensystems. Dementsprechend lassen sich Acetylcholinrezeptoren an Präparaten zentraler Ganglien aus Insekten elektrophysiologisch nachweisen. Der Nachweis gelingt sowohl an post- als auch an präsynaptischen Nervenendigungen, 25 sowie an den Zellkörpern von Interneuronen, Motoneuronen und modulatorischen Neuronen (Breer et al. 1987, Buckingham et al. 1997). Unter den Rezeptoren gibt es solche, die durch  $\alpha$ -Bungarotoxin inhibiert werden, und solche, die insensitiv sind (Schloß et al. 1988). Die Acetylcholinrezeptoren sind außerdem der molekulare Angriffspunkt wichtiger natürlicher (z.B. Nikotin) und synthetischer Insektizide (z.B. 30 Chloronikotinyle).

Die Gensequenz einer Anzahl von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren der Insekten ist bereits bekannt. So sind in *Drosophila melanogaster* die Sequenzen fünf verschiedener Untereinheiten beschrieben (Bossy et al. 1988, Hermanns-Borgmeyer et al. 35 1986, Sawruk et al. 1990a, 1990b, Schulz et al. unveröffentlicht, EMBL accession

5

number Y15593), in *Locusta migratoria* ebenfalls fünf (Stetzer et al. unveröffentlicht, EMBL accession numbers AJ000390 - AJ000393), in *Schistocerca gregaria* eine (Marshall et al. 1990), in *Mycus persicae* zwei (Sgard et al. unveröffentlicht, EMBL accession number X81887 und X81888), in *Manduca sexta* eine Sequenz (Eastham et al. 1997). Zudem ist eine Reihe von partiellen Gensequenzen aus *Drosophila melanogaster* als sog. expressed sequence tags charakterisiert worden (Genbank accession numbers AA540687, AA698155, AA697710, AA697326). Die hohe Ähnlichkeit einzelner Sequenzen mit solchen aus anderen Insekten legt nahe, daß es sich bei diesen Untereinheiten um funktionelle Homologe handelt.

15

Es ist von großer praktischer Bedeutung, beispielsweise für die Suche nach neuen Insektiziden, neue Untereinheiten von Acetylcholinrezeptoren aus Insekten bereitzustellen, wobei besonders solche von Interesse sind, die sich von den bekannten stärker unterscheiden, als dies zwischen funktionellen Homologen der Fall ist.

20

Der vorliegenden Erfindung liegt somit insbesondere die Aufgabe zugrunde, Nukleinsäuren zur Verfügung zu stellen, die neue Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten von Insekten kodieren.

25

Die Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung von Nukleinsäuren umfassend eine Sequenz ausgewählt aus

30

(a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5,

(b) zumindest 14 Basenpaare langen Teilsequenzen der unter (a) definierten Sequenzen,

35

5

- (c) Sequenzen, welche an die unter (a) definierten Sequenzen hybridisieren in 2 x SSC bei 60°C, bevorzugt in 0,5 x SSC bei 60°C, besonders bevorzugt in 0,2 x SSC bei 60°C (Sambrook et al. 1989),

10

- (d) Sequenzen, welche eine zumindest 70 %ige Identität zu den unter (a) definierten Sequenzen zwischen Position 1295 und Position 2195 aus SEQ ID NO: 1 oder zwischen Position 432 und Position 1318 aus SEQ ID NO: 3 oder zwischen Position 154 und Position 1123 aus SEQ ID NO: 5 aufweisen,

15

- (e) Sequenzen, welche zu den unter (a) definierten Sequenzen komplementär sind und

20

- (f) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneration des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz kodieren wie die unter (a) bis (d) definierten Sequenzen.

25

Der Grad der Identität der Nukleinsäuresequenzen wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms GAP aus dem Programm paket GCG, Version 9.1 unter Standard-einstellungen.

Die vorliegende Erfindung begründet sich auf den überraschenden Befund, daß Insekten Gene besitzen, die für Untereinheiten von insbesondere homooligomeren Acetylcholinrezeptoren kodieren.

30

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Vektoren, die zumindest eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten. Als Vektoren können alle in molekularbiologischen Laboratorien verwendete Plasmide, Phasmide, Cosmide, YACs oder künstliche Chromosomen verwendet werden. Für die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können diese mit üblichen regulatorischen Sequenzen verknüpft

5

werden. Die Auswahl solcher regulatorischen Sequenzen ist davon abhängig, ob zur Expression pro- oder eukaryotische Zellen bzw. zellfreie Systeme verwendet werden. Besonders bevorzugt als Expressionskontrollsequenz sind z.B. der frühe oder späte Promotor des SV40 oder des Adenovirus, des Cytomegalovirus, das lac-System, das  
10 trp-System, die Haupt-Operator- und Promotorregionen des Phagen lambda, die Kontrollregionen des fd-Hüllproteins, der Promotor der 3-Phosphoglyceratkinase, der Promotor der Sauren Phosphatase und der Promotor des  $\alpha$ -Mating-Faktors der Hefe.

10

Zur Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können diese in geeignete Wirtszellen eingebracht werden. Als Wirtszellen eignen sich sowohl prokaryotische Zellen, vorzugsweise E.coli, als auch eukaryotische Zellen, vorzugsweise Säuger- oder Insektenzellen. Weitere Beispiele für geeignete einzellige Wirtszellen sind:  
15 Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces, Hefen, HEK-293, Schneider S2, CHO-, COS1-, COS7-, Zellen, Pflanzenzellen in Zellkultur sowie Amphibienzellen, insbesondere Oocyten.  
20

20

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die Polypeptide, die von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodiert werden, sowie die daraus aufgebauten Acetylcholinrezeptoren, bevorzugt homooligomere Acetylcholinrezeptoren.

25

Zur Herstellung der Polypeptide, die von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodiert werden, können Wirtszellen, die zumindest eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten, unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden. Die gewünschten Polypeptide können danach auf übliche Weise aus den Zellen oder dem  
30 Kulturmedium isoliert werden.

30

Weiterhin sind Antikörper Gegenstand der Erfindung, die spezifisch an die vorstehend genannten Polypeptide bzw. Rezeptoren binden. Die Herstellung solcher Antikörper erfolgt auf die übliche Weise. Beispielsweise können solche Antikörper produziert werden durch die Injektion eines substanzell immunkompetenten Wirts mit einer für  
35

5

die Antikörperproduktion effektiven Menge eines erfindungsgemäßen Acetylcholinrezeptor-Polypeptids oder eines Fragments davon und durch nachfolgende Gewinnung dieses Antikörpers. Weiterhin lässt sich in an sich bekannter Weise eine immortalisierte Zelllinie erhalten, die monoklonale Antikörper produziert. Die 10 Antikörper können gegebenenfalls mit einem Nachweisreagenz markiert sein. Bevorzugte Beispiele für ein solches Nachweis-Reagenz sind Enzyme, radioaktiv markierte Elemente, fluoreszierende Chemikalien oder Biotin. Anstelle des vollständigen Antikörpers können auch Fragmente eingesetzt werden, die die gewünschten spezifischen Bindungseigenschaften besitzen.

15

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können insbesondere zur Herstellung transgener Invertebraten verwendet werden. Diese können in Testsysteme eingesetzt werden, die auf einer vom Wildtyp abweichenden Expression der erfindungsgemäßen Rezeptoren oder Varianten hiervon basieren. Ferner fallen hierunter sämtliche 20 transgenen Invertebraten, bei denen durch die Modifikation anderer Gene oder Genkontrollsequenzen (Promotoren) eine Veränderung der Expression der erfindungsgemäßen Rezeptoren oder deren Varianten eintritt.

25

Die Herstellung der transgenen Invertebraten erfolgt beispielsweise in *Drosophila melanogaster* durch P-Element vermittelten Gentransfer (Hay et al., 1997) oder in *Caenorhabditis elegans* durch Transposon vermittelten Gentransfer (z.B. durch Tc1, Plasterk, 1996).

30

Gegenstand der Erfindung sind somit auch transgene Invertebraten, die zumindest eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten, vorzugsweise transgene Invertebraten der Arten *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans*, sowie deren transgene Nachkommen. Vorzugsweise enthalten die transgenen Invertebraten die erfindungsgemäßen Rezeptoren in einer vom Wildtyp abweichenden Form.

35

5

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können auf die übliche Weise hergestellt werden. Beispielsweise können die Nukleinsäuremoleküle vollständig chemisch synthetisiert werden. Man kann auch nur kurze Stücke der erfindungsgemäßen Sequenzen chemisch synthetisieren und solche Oligonukleotide radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markieren. Die markierten Oligonukleotide können verwendet werden, um ausgehend von Insekten-mRNA hergestellte cDNA-Banken zu durchsuchen. Klone, an die die markierten Oligonukleotide hybridisieren, werden zur Isolierung der betreffenden DNA ausgewählt. Nach der Charakterisierung der isolierten DNA erhält man auf einfache Weise die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

10

Fluoreszenzfarbstoff markieren. Die markierten Oligonukleotide können verwendet werden, um ausgehend von Insekten-mRNA hergestellte cDNA-Banken zu durchsuchen. Klone, an die die markierten Oligonukleotide hybridisieren, werden zur Isolierung der betreffenden DNA ausgewählt. Nach der Charakterisierung der isolierten DNA erhält man auf einfache Weise die erfundungsgemäßen Nukleinsäuren.

15

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können zur Isolierung und Charakterisierung der regulatorischen Regionen, die natürlicherweise benachbart zu der kodierenden Region vorkommen, verwendet werden. Solche regulatorischen Regionen sind somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

25

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können neue Wirkstoffe für den Pflanzenschutz, wie Verbindungen, welche als Modulatoren, insbesondere als Agonisten oder Antagonisten, die Leitungseigenschaften der erfindungsgemäßen Acetylcholinrezeptoren verändern, identifiziert werden. Dazu wird ein rekombinantes DNA-Molekül, das zumindest eine erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt, in eine geeignete Wirtszelle eingebracht. Die Wirtzelle wird in Gegenwart einer Verbindung oder einer Probe, welche eine Vielzahl von Verbindungen umfaßt, unter Bedingungen kultiviert, die die Expression der erfindungsgemäßen Rezeptoren erlauben. Eine Veränderung der Rezeptoreigenschaften kann - wie nachstehend in Beispiel 2 beschrieben - detektiert werden. Auf diese Weise ist es möglich, insektizide Substanzen aufzufinden.

35

5

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ermöglichen auch das Auffinden von Verbindungen, die an die erfindungsgemäßen Rezeptoren binden. Diese können ebenfalls als Insektizide auf Pflanzen angewandt werden. Beispielsweise werden Wirtszellen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten und die entsprechenden Rezeptoren bzw.

10

Polypeptide exprimieren oder die Genprodukte selbst mit einer Verbindung oder einem Gemisch von Verbindungen unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die die Wechselwirkung zumindest einer Verbindung mit den Wirtszellen, den Rezeptoren oder den einzelnen Polypeptiden erlauben.

15

Unter Verwendung von Wirtszellen oder transgenen Invertebraten, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten, ist es auch möglich, Substanzen aufzufinden, welche die Expression der Rezeptoren verändern.

20

Die vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, Vektoren und regulatorischen Regionen können außerdem zum Auffinden von Genen verwendet werden, die für Polypeptide kodieren, welche am Aufbau von funktionell ähnlichen Acetylcholinrezeptoren in Insekten beteiligt sind. Unter funktionell ähnlichen Rezeptoren werden gemäß der vorliegenden Erfindung Rezeptoren verstanden, die Polypeptide umfassen, welche sich zwar hinsichtlich der Aminosäuresequenz von den hierin beschriebenen Polypeptiden unterscheiden, aber im wesentlichen dieselben Funktionen haben.

25

#### Erläuterungen zum Sequenzprotokoll und zu den Figuren:

30

SEQ ID NO: 1 zeigt die Nukleotidsequenz der isolierten Da7 cDNA, beginnend mit Position 1 und endend mit Position 2886. SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 2 zeigen ferner die Aminosäuresequenzen des von der Da7 cDNA Sequenz abgeleiteten Proteins.

35

5

SEQ ID NO: 3 zeigt die Nukleotidsequenz der isolierten Hva7-1 cDNA, beginnend mit Position 1 und endend mit Position 3700. SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 4 zeigen ferner die Aminosäuresequenzen des von der Hva7-1 cDNA Sequenz abgeleiteten Proteins.

10

SEQ ID NO: 5 zeigt die Nukleotidsequenz der isolierten Hva7-2 cDNA, beginnend mit Position 1 und endend mit Position 3109. SEQ ID NO: 5 und SEQ ID NO: 6 zeigen ferner die Aminosäuresequenzen des von der Hva7-2 cDNA Sequenz abgeleiteten Proteins.

15

Figur 1 zeigt den Anstieg des intrazellulären Calciums in gentechnisch veränderten Zellen gemäß Beispiel 2 nach Gabe von Nikotin. Zellen wurden mit Fura-2-acetoxymethylester (5 - 10  $\mu$ M in serumfreiem Minimal Essential Medium mit 1 % Rinderserumalbumin and 5 mM Calciumchlorid) beladen, mit N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (5 mM HEPES) gepufferter Tyrode-Lösung gewaschen und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Diaphot) abwechselnd mit Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm bestrahlt. Ein Meßpunkt entspricht einem Paar von Videobildern bei beiden Wellenlängen (Belichtungszeit pro Bild 100 ms). Der Zeitabstand von zwei Meßpunkten beträgt 3 s. Nach Aufnahme von 8 Bildern (Meßpunkt 4.0) wurde Nikotin auf eine Endkonzentration von 500  $\mu$ M zugegeben, und die Meßreihe fortgesetzt. Die Fluoreszenzintensität der Zellen bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 380 nm wurde durch die entsprechende Intensität bei 340 nm geteilt und so das Verhältnis („Ratio“) gebildet.

20

25

5

**Beispiele:**

**Beispiel 1**

10 Isolierung der beschriebenen Polynukleotidsequenzen

Die Manipulation von Polynukleotiden erfolgte nach Standardmethoden der rekombinanten DNA Technologie (Sambrook, et al., 1989). Die bioinformatische Bearbeitung von Nukleotid- und Proteinsequenzen erfolgten mit dem Programmpaket GCG Version 9.1 (GCG Genetics Computer Group, Inc., Madison Wisconsin, USA).

Partielle Polynukleotidsequenzen

20 Aus Proteinsequenzen von Genen, bei denen ihre Fähigkeit homooligomere Acetylcholinrezeptoren auszubilden bekannt war, wurden durch Sequenzvergleiche („Clustalw“) Bereiche identifiziert, aus denen durch Rücktranslation der Codons degenerierte Oligonukleotide abgeleitet wurden. Insgesamt wurden 5 solcher Oligonukleotidpaare für die Polymerasekettenreaktion (PCR) ausgewählt. Nur eine  
25 Kombination (vide infra) ergab ein Produkt sowohl aus *Heliothis*-cDNA als auch aus *Drosophila*-cDNA.

RNA wurde aus gesamten *Heliothis virescens*-Embryonen (kurz vor Schlupf) mittels Trizol-Reagenz (Gibco BRL, nach Angaben des Herstellers) isoliert. In gleicher Weise wurde mit *Drosophila*-Embryonen (24 h bei 25°C) verfahren. 10 µg dieser RNAs wurden in eine cDNA-Erststrangsynthese (Superscript Präamplifizierungssystem für die cDNA-Erststrangsynthese, Gibco BRL, nach Angaben des Herstellers, 45°C Reaktionstemperatur) eingesetzt.

5

Anschließend wurden jeweils 1/100 der o.g. Erststrang-cDNA in eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den Oligonukleotiden alpha7-1s: (5'-GAYGTIGAYGARAARAAYCA-3') und alpha7-2a: (5'-CYYTCRTCTIGCRCTRTTCTA-3') eingesetzt (Taq DNA Polymerase, rekombinant, Gibco BRL). Die PCR-Parameter waren wie folgt: Hva7-1 und Hva7-2: 94°C, 2 min; 35 mal (94°C, 45 s; 50°C, 30 s; 72°C, 60 s) sowie Da7: 96°C, 2 min; 35 mal (96°C, 45 s; 50°C, 30 s; 72°C, 60 s). Hieraus ergab sich jeweils eine im Agarosegel (1 %) erkennbare Bande von ca. 0,2 kb sowohl bei Drosophila-cDNA als auch bei Heliothis-cDNA. Nach Subklonierung der DNA-Fragmente mittels SrfScript (Stratagene) und Bestimmung der DNA-Sequenz, zeigte sich, daß aus Heliothis-cDNA zwei verschiedene DNA-Fragmente amplifiziert worden waren; diese waren 228-11 = Hva7-1 (partiell, mit 165 bp) und 228-8 = Hva7-2 (partiell, mit 171 bp). Aus Drosophila-cDNA wurde nur ein DNA-Fragment isoliert; dieses war 248-5 = Da7 (partiell, mit 150 bp).

10

Isolierung von poly A enthaltender RNA aus Heliothis virescens-Gewebe und Konstruktion der cDNA-Bibliotheken

15

Die RNA für die cDNA-Bibliothek I wurde aus gesamten Heliothis virescens-Embryonen (kurz vor Schlupf) mittels Trizol-Reagenz (Gibco BRL, nach Angaben des Herstellers) isoliert. Die RNA für die cDNA-Bibliothek II wurde aus gesamten Kopfganglien von 500 Heliothis virescens-Larven (Stadien 4-5) mittels Trizol-Reagenz (Gibco BRL, nach Angaben des Herstellers) isoliert. Aus diesen RNAs wurden nun die poly A enthaltenden RNAs durch Reinigung über Dyna Beads 280 (Dynal) isoliert. 5 µg dieser poly A enthaltenden RNAs wurden anschließend in die Konstruktion der cDNA-Bibliotheken I und II mit dem λ-ZAPExpress Vektor eingesetzt (cDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA Synthesis Kit und ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit, alle Stratagene). In Abweichung von den Angaben des Herstellers wurde zur cDNA-Synthese die Reverse Transkriptase Superscript (Gibco BRL) bei einer Synthesetemperatur von 45°C verwendet. Außerdem wurde

20

25

30

35

5

auf die Zugabe radioaktiv markierter Desoxynukleosidtriphosphate verzichtet. Desweiteren wurden die synthetisierten cDNAs nicht über das im Kit enthaltene Gelfiltrationsmedium, sondern über Size Sep 400 Spun Columns (Pharmacia) fraktioniert.

10

#### Vollständige Polynukleotidsequenzen

15

Mit Ausnahme der ersten Screening Runde bei der Isolierung des Hva7-1 Klons, erfolgten alle Screens mit Hilfe des DIG Systems (alle Reagenzien und Verbrauchsmaterialien Boehringer Mannheim, nach Angaben im „The DIG System User's Guide for Filter Hybridization“, Boehringer Mannheim). Die eingesetzten DNA-Sonden wurden durch PCR mittels Digoxigenin markiertem dUTP präpariert, Die Hybridisierungen erfolgten in DIG Easy Hyb (Boehringer Mannheim) bei 42°C über Nacht. Der Nachweis markierter DNA auf Nylonmembranen geschah durch Chemolumineszenz (CDP-Star, Boehringer Mannheim) unter Verwendung von Röntgenfilmen (Hyperfilm MP, Amersham). Die isolierten Genbankplasmide wurden zur Identifikation mittels T3 und T7 Primer ansequenziert (ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, ABI, mit ABI Prism 310 Genetic Analyzer). Die Bestimmung der vollständigen Polynukleotidsequenzen in Hva7-1, Hva7-2 und Da7 erfolgte durch Primer Walking mittels Cycle Sequencing als Auftragssequenzierung bei der Firma Qiagen, Hilden.

20

##### a. Isolierung des Da7 Klons

25

30

$10^6$  Phagen einer Drosophila melanogaster-cDNA-Bibliothek in  $\lambda$  Phagen (Canton-S embryo, 2-14 Stunden, in Uni-ZAP XR Vektor, Stratagene) wurden einem Screening mit DIG markiertem 248-5 als Sonde unterzogen (nach Angaben des Herstellers Stratagene). Die maximale Stringenz beim Waschen der Filter betrug: 0,2 x SSC; 0,1 % SDS; 42°C; 2 x 15 min. Es konnte ein Klon isoliert werden(Klon 432-1), dessen Insert eine Größe von 2940 bp aufwies (Da7, SEQ ID NO: 1). Der größte

35

5

offene Leserahmen dieser Sequenz beginnt bei der Position 372 der dargestellten Sequenz und endet bei Position 1822. Die hieraus abgeleitete Polypeptidsequenz von 770 Aminosäuren (SEQ ID NO: 2) kodiert für ein Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 87,01 kD.

10

b. Isolierung des Hva7-1 Klons

In das Screening gingen  $10^6$  Phagen der Heliothis virescens-Embryo-cDNA-Bibliothek (Bibliothek I) ein. Die erste von drei Screening Runden fand unter Verwendung  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$  markierter 228-11 DNA als Sonde statt. Die Hybridisierung der Sonde an die Filter erfolgte in Quickhyb (Stratagene) bei 68°C für eine Stunde. Anschließend wurden die Filter zwei mal je 15 min bei Raumtemperatur in 2 x SSC; 0,1 % SDS und 2 mal je 30 min bei 42°C in 0,1xSSC; 0,1 % SDS gewaschen. Die Detektion hybridisierter Sonde erfolgte durch Autoradiographie mit XR Röntgenfilmen (Kodak) unter Verwendung von Verstärkerfolien (Amersham) bei -80°C über Nacht. Die zwei weiteren Screening Runden erfolgten unter Verwendung des DIG · Systems (Boehringer Mannheim).

Der in diesem Screen isolierte Klon 241-5 enthielt ein Insert von 3630 bp. Dieses Insert (Hva7-1, SEQ ID NO: 3) besitzt einen längsten offenen Leserahmen, der bei Position 335 der dargestellten Nukleinsäuresequenz beginnt und bei Position 1821 endet. Das hieraus abgeleitete Polypeptid von 496 Aminosäuren (SEQ ID NO: 4) kodiert für ein Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 56,36 kD.

25

30

35

5

c. Isolierung des Hva7-2 Klons

In das Screening gingen  $10^6$  Phagen der Heliothis virescens-Ganglien-cDNA-Bibliothek (Bibliothek II) ein. Als Sonde wurde Dig markierte 228-8 DNA verwendet. Die maximale Stringenz beim Waschen der Filter betrug: 0,1 x SSC; 0,1% SDS; 42°C; 2 x 15 min.

10

Der in diesem Screen isolierte Klon 241-5 enthielt ein Insert von 3630 bp. Dieses Insert (Hva7-2, SEQ ID NO: 5) besitzt einen längsten offenen Leserahmen, der bei Position 95 der dargestellten Nukleinsäuresequenz beginnt und bei Position 1598 endet. Das hieraus abgeleitete Polypeptid von 501 Aminosäuren (SEQ ID NO: 6) kodiert für ein Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 56,71 kD.

15

**Beispiel 2**

20

Generierung der Expressionskonstrukte

a. Da7

25

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde der Sequenzbereich von Position 372 bis Position 2681 aus SEQ ID NO: 1 amplifiziert. Hierzu wurden Desoxyoligonukleotide mit den Sequenzen

GCGAATTCAACCACCATGAAAAATGCACAACTG sowie  
CGAGACAATAATATGTGGTGCCTCGAG verwendet. Als DNA-Polymerase wurde die Pfu-Polymerase von Stratagene nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach erfolgter Amplifikation wurde das generierte Stück mit den Restriktionsendonukleasen Eco RI und Xho I verdaut und in einen ebenfalls Eco RI und Xho verdauten Vektor pcDNA3.1/Zeo (Invitrogen) einkloniert.

30

35

5

b. Hva7-1

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde der Sequenzbereich von Position 335 bis Position 1822 aus SEQ ID NO: 3 amplifiziert. Hierzu wurden Desoxyoligonukleotide mit den Sequenzen

GCAAGCTTACCACCATGGGAGGTAGAGCTAGACGCTCGCAC sowie GCCTCGAGCGACACCATGATGTGTGGCGC verwendet. Als DNA-Polymerase wurde die Pfu-Polymerase von Stratagene nach Angaben des Herstellers verwendet.

15 Nach erfolgter Amplifikation wurde das generierte Stück mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und Xho I verdaut und in einen ebenfalls HindIII und Xho verdauten Vektor pcDNA3.1/Zeo (Invitrogen) einkloniert.

c. Hva7-2

20 Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde der Sequenzbereich von Position 95 bis Position 1597 aus SEQ ID NO: 5 amplifiziert. Hierzu wurden Desoxyoligonukleotide mit den Sequenzen

GCAAGCGCCGCTATGGCCCCTATGTTG sowie TTGCACGATGATATGCGGTGCCTCGAGCG verwendet. Als DNA-Polymerase wurde die Pfu-Polymerase von Stratagene nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach erfolgter Amplifikation wurde das generierte Stück mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und Xho I verdaut und in einen ebenfalls HindIII und Xho verdauten Vektor pcDNA3.1/Zeo (Invitrogen) einkloniert.

30

d. Hva7-1 / 5HT<sub>3</sub> sowie Hva7-2 / 5HT<sub>3</sub> Chimären

Durch die Methode der Overlap Extension (Jespersen et al. 1997) wurde jeweils der Bereich von Position 335 bis Position 1036 aus SEQ ID NO: 3 (Hva7-1/5HT<sub>3</sub> Chimäre) sowie der Bereich von Position 95 bis Position 763 aus SEQ ID NO: 5 (Hva7-2/5HT<sub>3</sub> Chimäre) mit dem Bereich von Position 778 bis Position 1521 aus der

5

Mus musculus 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor-cDNA (Sequenz in EMBL Datenbank: M774425) fusioniert. Die beiden Fragmente wurden anschließend mittels TA Cloning (Invitrogen, nach Angaben des Herstellers) in den pcDNA3.1/Zeo Vektor kloniert. Konstrukte mit korrekter Orientierung der beiden Fragmente im Vektor wurden durch Sequenzierung mit dem T7 Primer (Invitrogen) identifiziert.

10

#### Zellkultur und Gentransfer

HEK293-Zellen, die die  $\alpha$ -Untereinheit eines L-Typ Ca-Kanals exprimieren (Zong et al. 1995, Stetzer et al. 1996), wurden in Dulbeccos Modified Eagles Medium und

15 10 % foetalem Kälberserum bei 5 % CO<sub>2</sub> und 20°C bis 37°C kultiviert. Für den Gentransfer wurde FuGENE 6 (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. 24 h bis 48 h nach dem Gentransfer wurden die Zellen in verschiedenen Dichten in Mikrotiterplatten ausgesät.

20

Gentechnisch veränderte Zellen wurden durch Wachstum in Dulbeccos Modified Eagles Medium und 10 % foetalem Kälberserum und 150 - 500 ug/ml Zeocin während 3 bis 4 Wochen selektioniert. Resistente Einzelklone wurden wie unten beschrieben analysiert.

25

#### Fura-2-Messungen

Die Veränderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration wurden mit Fura-2 gemessen. Eine Stammlösung mit 2 mM Fura-2-acetoxymethylester (Sigma) in

30 Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde auf eine Endkonzentration von 5 - 10  $\mu$ M in serumfreiem Minimal Essential Medium (MEM, Gibco) mit 1% Rinderserumalbumin und 5 mM Calciumchlorid verdünnt. Die Zellen wurden in einer Mikrotiterplatte in dieser Lösung 45 bis 60 min lang inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (5 mM HEPES) gepufferter Tyrode-Lösung (HEPES-gepufferte Salzlösung mit

35

130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM

5

Glucose) gewaschen. 100 µl Tyrodepuffer wurde in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben und die Zellen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Diaphot) abwechselnd mit Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm bestrahlt. Eine Serie von Videobildern (Belichtungszeit pro Bild 100 ms) wurde mit  
10 Pausen von 3 Sekunden aufgenommen und als digitalisierte Bilder in einem Bildanalyse-Computer gespeichert (Leica, Quantimet 570). Nach Aufnahme von 8 Bildern (Meßpunkt 4.0 in Fig. 1) wurde Nikotin auf eine Endkonzentration von 500 µM zugegeben, und die Meßreihe fortgesetzt. Die Fluoreszenzintensität der Zellen bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 380 nm wurde durch die entsprechende  
15 Intensität bei 340 nm geteilt und so ein Verhältnis gebildet, das den relativen Anstieg der Calcium-Konzentration darstellt (Grynkiewicz et al. 1985).

**Literatur:**

20 Bossy et al. (1988) Conservation of neural nicotinic acetylcholine receptors from Drosophila to vertebrate central nervous systems, EMBO J. 7, 611-618

Breer et al. (1987) Molecular properties and functions of insect acetylcholine receptors, J. Insect Physiol. 33, 771-790

25

Buckingham et al. (1997) Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors, J.Exp. Biol. 200, 2685-2692

30

Changeux et al. (1992) The functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor explored by affinity labelling and site-directed mutagenesis, Quarterly Review of Biophysics 25, 395-432

Claudio et al. (1983) Nucleotide and deduced amino acid sequences of Torpedo californica acetylcholine receptor g subunit, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1111-

35

1115

5

Devillers-Thiery et al. (1983) Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding  $\alpha$ -subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2067-2071

10

Elgoyen et al. (1997) US Pat. No. 5,683,912

Eastham et al. (1998) Characterisation of a nicotinic acetylcholine receptor from the insect *Manduca sexta*, Eur. J. Neurosci 10, 879-889

15

Grynkiewicz et al. (1985) A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties, J Biol Chem. 260, 3440-3450

20

Hay et al. (1997), P element insertion-dependent gene activation in the *Drosophila* eye, Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America 94 (10), 5195-5200

Hermans-Borgmeyer et al. (1986) Primary structure of a developmentally regulated nicotinic acetylcholine receptor protein from *Drosophila* EMBO J. 5, 1503-1508

25

Heinemann et al. (1997) US Pat. No 5,591,590

Jespersen et al. (1997) Efficient Non-PCR-Mediated Overlap Extension of PCR Fragments by Exonuclease „End Polishing“, Biotechniques, 23, 48-52

30

Lindstrom et al. (1997) US Pat. No. 5,599,709

Marshall et al. (1990) Sequence and functional expression of a single  $\alpha$  subunit of an insect nicotinic acetylcholine receptor, EMBO J. 9, 4391-4398

35

5

Noda et al. (1982), Primary structure of  $\alpha$ -subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence, *Nature* 299, 793-797

10

Noda et al. (1983a), Primary structures of  $\beta$ - and  $\delta$ -subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences, *Nature* 301, 251-255

Noda et al. (1983a), Structural homology of *Torpedo californica* acetylcholine receptor subunits, *Nature* 302, 528-532

15

Ortells et al. (1995), Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors, *Trends in Neuroscience* 18, 121-127

20

Plasterk (1996), The Tc1/mariner transposon family, *Transposable Elements/Current Topics in Microbiology and Immunology* 204, 125-143

Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbour Press

25

Sawruk et al. (1990a), *EMBO J.* 9, 2671-2677 Heterogeneity of *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptors: SAD, a novel developmentally regulated  $\alpha$ -subunit

30

Sawruk et al. (1990b), SBD, a novel structural subunit of the *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptor, shares 1st genomic localization with two  $\alpha$ -subunits, *FEBS Lett.* 273, 177-181

Schloß et al. (1988), Neuronal acetylcholine receptors of *Drosophila*: the ARD protein is a component of a high-affinity  $\alpha$ -bungarotoxin binding complex, *EMBO J* 7, 2889-2984

35

5

Stetzer et al. (1996) Stable expression in HEK-293 cells of the rat  $\alpha 3/\beta 4$  subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptor, FEBS Lett. 397, 39-44

10 Zong et al. (1995) On the regulation of the expressed L-type calcium channel by cAMP-dependent phosphorylation, Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. 430, 340-347.

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER:
  - (A) NAME: Bayer Aktiengesellschaft
  - (B) STRASSE: Bayerwerk
  - (C) ORT: Leverkusen
  - (E) LAND: Deutschland
  - (F) POSTLEITZAHL: D 51368
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Nukleinsäuren, die für Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten von Insekten kodieren
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6
- (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
  - (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
  - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
  - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 2886 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Drosophila melanogaster
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
  - (B) CLON(E): Da7
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
  - (B) LAGE: 372..2681

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GGCACGAGAA AAAGTTGTGG TATAAACTTT TATTGTAGGA AAACGCATAA AAATAATAGA	60
AAAACGCTCT TCGGGTTGTA AAGAAAATAA GAAGACAAAA GAAAGACATG AAAACGTTGC	120
AAACAATAAA GCATATACTT GCCATATTGA TATAAAGGGA AATCGTGAAA AGGCGGTGAA	180
AATTCGTAA GATTAGTTGG TATTAAGGGC AGCCCATGCA CACAGCTAAA AAGGGAACTA	240

AAAAAAACCC GCACAGAAC AATGAAAGCTG CAGCAGCTGG ATAAGGCCGA CAAAACCGAA	300
AATTATATTA TTGTAATCTA GTAGAGAGCA GACAACATAT CCGCTGGCAA CAACCAACAC	360
CGAAAGAGAC T ATG AAA AAT GCA CAA CTG AAA CTG ACT GAA GTT GAC GAT Met Lys Asn Ala Gln Leu Lys Leu Thr Glu Val Asp Asp	410
1 5 10	
GAT GAG CTG TGG CTG GCA GTA AGA TTA GCG CAC TGC AGC AGC AAC TTT Asp Glu Leu Trp Leu Ala Val Arg Leu Ala His Cys Ser Ser Asn Phe	458
15 20 25	
AGC AGC AGT AGC AGC ACA AGA ACC ACC AGC AGC AAC CAG AGG CAC AAC Ser Ser Ser Ser Thr Arg Thr Ser Ser Asn Gln Arg His Asn	506
30 35 40 45	
CAG CAA CTC ACA ACA CTG CAA CCA AGG AGC TTA AGT ACA AAA CAC CAC Gln Gln Leu Thr Leu Gln Pro Arg Ser Leu Ser Thr Lys His His	554
50 55 60	
AGC AAC ATT GCA AGC GAG CAG CAC AAT AGC CAG CAA CAG GAG CCA GCA Ser Asn Ile Ala Ser Glu Gln His Asn Ser Gln Gln Gln Glu Pro Ala	602
65 70 75	
TCG AAG GAC GAG GAT GTA GCC AAC CAC GGT AGA AGC AAT GAC CAG CAG Ser Lys Asp Glu Asp Val Ala Asn His Gly Arg Ser Asn Asp Gln Gln	650
80 85 90	
ACG CAT CTG CAA CAG CTA GAC AGC AGC AAC ATG TTG TCG CCA AAG ACA Thr His Leu Gln Gln Leu Asp Ser Ser Asn Met Leu Ser Pro Lys Thr	698
95 100 105	
GCC GCA GCA GCA ACT GCT GCC GGC GAT GAA GCA ACA ACC CAA CAA CCA Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ala Gly Asp Glu Ala Thr Thr Gln Gln Pro	746
110 115 120 125	
ACA AAC ATA AGA CTG TGT GCA CGC AAG CGA CAA CGA TTG CGT CGC CGA Thr Asn Ile Arg Leu Cys Ala Arg Lys Arg Gln Arg Leu Arg Arg Arg	794
130 135 140	
CGA AAA AGA AAA CCA GCA ACC CCA AAC GAA ACA GAT ATC AAG AAA CAA Arg Lys Arg Lys Pro Ala Thr Pro Asn Glu Thr Asp Ile Lys Lys Gln	842
145 150 155	
CAG CAA CTT AGC ATG CCT CCC TTC AAA ACG CGC AAA TCC ACG GAC ACC Gln Gln Leu Ser Met Pro Pro Phe Lys Thr Arg Lys Ser Thr Asp Thr	890
160 165 170	
TAC AGC ACA CCA GCA GCA ACA ACC AGC TGT CCG ACA GCC ACC TAC ATG Tyr Ser Thr Pro Ala Ala Thr Thr Ser Cys Pro Thr Ala Thr Tyr Met	938
175 180 185	
CAA TGT CGA GCC AGC GAC AAT GAG TTC AGT ATT CCG ATA TCG AGA CAT Gln Cys Arg Ala Ser Asp Asn Glu Phe Ser Ile Pro Ile Ser Arg His	986
190 195 200 205	
GAT AGA GTA TCC ACG GCC ACA TTC GCC TGG GTG TTG CAT GTG CTG CAG Asp Arg Val Ser Thr Ala Thr Phe Ala Trp Val Leu His Val Leu Gln	1034
210 215 220	
GTG CTG CTC GTG TCG CTG CAA CAG TGG CAA CTT CAC GTG CAA CAG CGA Val Leu Leu Val Ser Leu Gln Gln Trp Gln Leu His Val Gln Gln Arg	1082
225 230 235	
TCG GTG CTA CTG TTC AGA AGG ATC GCA GCG AGC ACC ATC GCC TTC ATT Ser Val Leu Leu Phe Arg Arg Ile Ala Ala Ser Thr Ile Ala Phe Ile	1130
240 245 250	

TCC TAT TTA GGC AGC TTT GCA GCG CAA CTG AAA AAT AGC AGC AGC AGC Ser Tyr Leu Gly Ser Phe Ala Ala Gln Leu Lys Asn Ser Ser Ser Ser 255 260 265	1178
AGT AGC AGC AGC AAC AGC AGC AAC AAC AGC AGC ACG CAA ATA TTA AAC Ser Ser Ser Ser Asn Ser Ser Asn Asn Ser Ser Thr Gln Ile Leu Asn 270 275 280 285	1226
GGA CTT AAT AAA CAC TCA TGG ATA TTT TTA TTG ATA TAT TTG AAT TTA Gly Leu Asn Lys His Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ile Tyr Leu Asn Leu 290 295 300	1274
TCT GCT AAA GTT TGC CTA GCA GGA TAT CAT GAA AAG AGA CTG TTA CAC Ser Ala Lys Val Cys Leu Ala Gly Tyr His Glu Lys Arg Leu Leu His 305 310 315	1322
GAT CTT TTG GAT CCT TAT AAT ACA CTA GAA CGT CCC GTT CTC AAT GAA Asp Leu Leu Asp Pro Tyr Asn Thr Leu Glu Arg Pro Val Leu Asn Glu 320 325 330	1370
TCG GAC CCG TTA CAA TTA AGC TTT GGT TTA ACT TTA ATG CAA ATT ATC Ser Asp Pro Leu Gln Leu Ser Phe Gly Leu Thr Leu Met Gln Ile Ile 335 340 345	1418
GAT GTG GAC GAG AAA AAT CAA TTG CTA GTC ACT AAT GTG TGG TTA AAA Asp Val Asp Glu Lys Asn Gln Leu Leu Val Thr Asn Val Trp Leu Lys 350 355 360 365	1466
CTG GAG TGG AAC GAC ATG AAT CTC CGC TGG AAC ACC TCC GAC TAT GGC Leu Glu Trp Asn Asp Met Asn Leu Arg Trp Asn Thr Ser Asp Tyr Gly 370 375 380	1514
GGA GTT AAG GAT CTG CGA ATA CCG CCG CAT CGC ATC TGG AAG CCG GAC Gly Val Lys Asp Leu Arg Ile Pro Pro His Arg Ile Trp Lys Pro Asp 385 390 395	1562
GTG CTG ATG TAC AAC AGT GCG GAT GAG GGA TTT GAC GGC ACC TAC CAG Val Leu Met Tyr Asn Ser Ala Asp Glu Gly Phe Asp Gly Thr Tyr Gln 400 405 410	1610
ACG AAC GTG GTG CGG AAC AAC GGC TCG TGT CTA TAC GTT CCG CCG Thr Asn Val Val Val Arg Asn Asn Gly Ser Cys Leu Tyr Val Pro Pro 415 420 425	1658
GGG ATC TTC AAG TCG ACG TGC AAG ATC GAC ATC ACG TGG TTC CCC TTC Gly Ile Phe Lys Ser Thr Cys Lys Ile Asp Ile Thr Trp Phe Pro Phe 430 435 440 445	1706
GAT GAC CAG CGG TGC GAG ATG AAG TTC GGC AGT TGG ACC TAC GAC GGA Asp Asp Gln Arg Cys Glu Met Lys Phe Gly Ser Trp Thr Tyr Asp Gly 450 455 460	1754
TTC CAG CTG GAT TTA CAA TTA CAA GAT GAA ACT GGC GGT GAT ATC AGC Phe Gln Leu Asp Leu Gln Asp Glu Thr Gly Gly Asp Ile Ser 465 470 475	1802
AGT TAC GTG CTC AAC GGC GAG TGG GAA CTA CTG GGT GTG CCC GGC AAA Ser Tyr Val Leu Asn Gly Glu Trp Glu Leu Leu Gly Val Pro Gly Lys 480 485 490	1850
CGT AAC GAG ATC TAT TAC AAC TGC TGC CCG GAA CCC TAT ATA GAC ATC Arg Asn Glu Ile Tyr Tyr Asn Cys Cys Pro Glu Pro Tyr Ile Asp Ile 495 500 505	1898
ACC TTC GCC ATC ATC ATC CGC CGA CGA ACA CTG TAC TAT TTC TTC AAC Thr Phe Ala Ile Ile Ile Arg Arg Arg Thr Leu Tyr Tyr Phe Phe Asn 510 515 520 525	1946

CTG ATC ATA CCT TGT GTA CTG ATT GCC TCC ATG GCC TTG CTC GGA TTC Leu Ile Ile Pro Cys Val Leu Ile Ala Ser Met Ala Leu Leu Gly Phe 530 535 540	1994
ACC CTG CCG CCA GAT TCG GGT GAA AAA TTA TCG CTG GGT GTT ACC ATC Thr Leu Pro Pro Asp Ser Gly Glu Lys Leu Ser Leu Gly Val Thr Ile 545 550 555	2042
TTG CTC TCG CTG ACC GTG TTT CTG AAT ATG GTT GCC GAG ACA ATG CCG Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Leu Asn Met Val Ala Glu Thr Met Pro 560 565 570	2090
GCT ACT TCC GAT GCG GTG CCA TTG TGG ATA CGC ATC GTG TTT TTG TGC Ala Thr Ser Asp Ala Val Pro Leu Trp Ile Arg Ile Val Phe Leu Cys 575 580 585	2138
TGG CTG CCA TGG ATA TTG CGA ATG AGT CGC CCA GGA CGA CCG CTG ATC Trp Leu Pro Trp Ile Leu Arg Met Ser Arg Pro Gly Arg Pro Leu Ile 590 595 600 605	2186
CTA GAG TTC CCG ACC ACG CCC TGT TCG GAC ACA TCC TCC GAG CGG AAG Leu Glu Phe Pro Thr Thr Pro Cys Ser Asp Thr Ser Ser Glu Arg Lys 610 615 620	2234
CAC CAG ATA CTC TCC GAC GTT GAG CTG AAA GAG CGC TCG TCG AAA TCG His Gln Ile Leu Ser Asp Val Glu Leu Lys Glu Arg Ser Ser Lys Ser 625 630 635	2282
CTG CTG GCC AAC GTA CTA GAC ATC GAT GAT GAC TTC CGG CAC AAT TGT Leu Leu Ala Asn Val Leu Asp Ile Asp Asp Asp Phe Arg His Asn Cys 640 645 650	2330
CGC CCC ATG ACG CCC GGC GGA ACA CTG CCA CAC AAC CCG GCT TTC TAT Arg Pro Met Thr Pro Gly Gly Thr Leu Pro His Asn Pro Ala Phe Tyr 655 660 665	2378
CGC ACG GTT TAT GGA CAA GGC GAC GAT GGC AGC ATT GGG CCA ATT GGC Arg Thr Val Tyr Gly Gln Gly Asp Asp Gly Ser Ile Gly Pro Ile Gly 670 675 680 685	2426
AGC ACC CGA ATG CCG GAT GCG GTC ACC CAT CAT ACG TGC ATC AAA TCA Ser Thr Arg Met Pro Asp Ala Val Thr His His Thr Cys Ile Lys Ser 690 695 700	2474
TCA ACT GAA TAT GAA TTA GGT TTA ATC TTA AAG GAA ATT CGC TTT ATA Ser Thr Glu Tyr Glu Leu Gly Leu Ile Leu Lys Glu Ile Arg Phe Ile 705 710 715	2522
ACT GAT CAG CTA CGT AAA GAT GAC GAG TGC AAT GAC ATT GCC AAT GAT Thr Asp Gln Leu Arg Lys Asp Asp Glu Cys Asn Asp Ile Ala Asn Asp 720 725 730	2570
TGG AAA TTT GCA GCT ATG GTC GTT GAC AGA CTG TGC CTT ATC ATA TTC Trp Lys Phe Ala Ala Met Val Val Asp Arg Leu Cys Leu Ile Ile Phe 735 740 745	2618
ACA ATG TTC GCA ATA TTA GCC ACA ATA GCT GTA CTA CTA TCG GCA CCA Thr Met Phe Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala Val Leu Leu Ser Ala Pro 750 755 760 765	2666
CAT ATT ATT GTC TCG TAGCCATATG GGCGAGGTGG TTATTGTTAT TGGTTTTATT His Ile Ile Val Ser	2721
770	
ATAAAATCAA TTTGTTAATT ATTAAATTAA TAACGAAACT CTTTAAGTAA ATAAAAACTA	2781
AAAAGACACT AAAAAAGCAC AAAAAAATAG GAAAATACAT GATAAAACCC ATGAACTAAA	2841

TAATACATCC AAGAAAAACC AAAACAAAAA AAAAAAAA AAAAAA

2886

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 770 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein  
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Asn Ala Gln Leu Lys Leu Thr Glu Val Asp Asp Asp Glu Leu  
 1 5 10 15

Trp Leu Ala Val Arg Leu Ala His Cys Ser Ser Asn Phe Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Ser Thr Arg Thr Ser Ser Asn Gln Arg His Asn Gln Gln Leu  
 35 40 45

~~Thr~~ Thr Leu Gln Pro Arg Ser Leu Ser Thr Lys His His Ser Asn Ile  
 50 55 60

Ala Ser Glu Gln His Asn Ser Gln Gln Glu Pro Ala Ser Lys Asp  
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Asn His Gly Arg Ser Asn Asp Gln Gln Thr His Leu  
 85 90 95

Gln Gln Leu Asp Ser Ser Asn Met Leu Ser Pro Lys Thr Ala Ala Ala  
 100 105 110

Ala Thr Ala Ala Gly Asp Glu Ala Thr Thr Gln Gln Pro Thr Asn Ile  
 115 120 125

Arg Leu Cys Ala Arg Lys Arg Gln Arg Leu Arg Arg Arg Arg Lys Arg  
 130 135 140

Lys Pro Ala Thr Pro Asn Glu Thr Asp Ile Lys Lys Gln Gln Gln Leu  
 145 150 155 160

Ser Met Pro Pro Phe Lys Thr Arg Lys Ser Thr Asp Thr Tyr Ser Thr  
 165 170 175

Pro Ala Ala Thr Thr Ser Cys Pro Thr Ala Thr Tyr Met Gln Cys Arg  
 180 185 190

Ala Ser Asp Asn Glu Phe Ser Ile Pro Ile Ser Arg His Asp Arg Val  
 195 200 205

Ser Thr Ala Thr Phe Ala Trp Val Leu His Val Leu Gln Val Leu Leu  
 210 215 220

Val Ser Leu Gln Gln Trp Gln Leu His Val Gln Gln Arg Ser Val Leu  
 225 230 235 240

Leu Phe Arg Arg Ile Ala Ala Ser Thr Ile Ala Phe Ile Ser Tyr Leu  
 245 250 255

Gly Ser Phe Ala Ala Gln Leu Lys Asn Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
 260 265 270

Ser Asn Ser Ser Asn Asn Ser Ser Thr Gln Ile Leu Asn Gly Leu Asn  
 275 280 285

Lys His Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ile Tyr Leu Asn Leu Ser Ala Lys  
 290 295 300  
 Val Cys Leu Ala Gly Tyr His Glu Lys Arg Leu Leu His Asp Leu Leu  
 305 310 315 320  
 Asp Pro Tyr Asn Thr Leu Glu Arg Pro Val Leu Asn Glu Ser Asp Pro  
 325 330 335  
 Leu Gln Leu Ser Phe Gly Leu Thr Leu Met Gln Ile Ile Asp Val Asp  
 340 345 350  
 Glu Lys Asn Gln Leu Leu Val Thr Asn Val Trp Leu Lys Leu Glu Trp  
 355 360 365  
 Asn Asp Met Asn Leu Arg Trp Asn Thr Ser Asp Tyr Gly Gly Val Lys  
 370 375 380  
 Asp Leu Arg Ile Pro Pro His Arg Ile Trp Lys Pro Asp Val Leu Met  
 385 390 395 400  
 Tyr Asn Ser Ala Asp Glu Gly Phe Asp Gly Thr Tyr Gln Thr Asn Val  
 405 410 415  
 Val Val Arg Asn Asn Gly Ser Cys Leu Tyr Val Pro Pro Gly Ile Phe  
 420 425 430  
 Lys Ser Thr Cys Lys Ile Asp Ile Thr Trp Phe Pro Phe Asp Asp Gln  
 435 440 445  
 Arg Cys Glu Met Lys Phe Gly Ser Trp Thr Tyr Asp Gly Phe Gln Leu  
 450 455 460  
 Asp Leu Gln Leu Gln Asp Glu Thr Gly Asp Ile Ser Ser Tyr Val  
 465 470 475 480  
 Leu Asn Gly Glu Trp Glu Leu Leu Gly Val Pro Gly Lys Arg Asn Glu  
 485 490 495  
 Ile Tyr Tyr Asn Cys Cys Pro Glu Pro Tyr Ile Asp Ile Thr Phe Ala  
 500 505 510  
 Ile Ile Ile Arg Arg Arg Thr Leu Tyr Tyr Phe Phe Asn Leu Ile Ile  
 515 520 525  
 Pro Cys Val Leu Ile Ala Ser Met Ala Leu Leu Gly Phe Thr Leu Pro  
 530 535 540  
 Pro Asp Ser Gly Glu Lys Leu Ser Leu Gly Val Thr Ile Leu Leu Ser  
 545 550 555 560  
 Leu Thr Val Phe Leu Asn Met Val Ala Glu Thr Met Pro Ala Thr Ser  
 565 570 575  
 Asp Ala Val Pro Leu Trp Ile Arg Ile Val Phe Leu Cys Trp Leu Pro  
 580 585 590  
 Trp Ile Leu Arg Met Ser Arg Pro Gly Arg Pro Leu Ile Leu Glu Phe  
 595 600 605  
 Pro Thr Thr Pro Cys Ser Asp Thr Ser Ser Glu Arg Lys His Gln Ile  
 610 615 620  
 Leu Ser Asp Val Glu Leu Lys Glu Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Ala  
 625 630 635 640  
 Asn Val Leu Asp Ile Asp Asp Asp Phe Arg His Asn Cys Arg Pro Met

645

650

655

Thr Pro Gly Gly Thr Leu Pro His Asn Pro Ala Phe Tyr Arg Thr Val  
 660 665 670

Tyr Gly Gln Gly Asp Asp Gly Ser Ile Gly Pro Ile Gly Ser Thr Arg  
 675 680 685

Met Pro Asp Ala Val Thr His His Thr Cys Ile Lys Ser Ser Thr Glu  
 690 695 700

Tyr Glu Leu Gly Leu Ile Leu Lys Glu Ile Arg Phe Ile Thr Asp Gln  
 705 710 715 720

Leu Arg Lys Asp Asp Glu Cys Asn Asp Ile Ala Asn Asp Trp Lys Phe  
 725 730 735

Ala Ala Met Val Val Asp Arg Leu Cys Leu Ile Ile Phe Thr Met Phe  
 740 745 750

Ala Ile Leu Ala Thr Ile Ala Val Leu Leu Ser Ala Pro His Ile Ile  
 755 760 765

Val Ser  
 770

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 3700 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Heliothis virescens

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON(E): Hva7-1

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 335..1822

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GGCACGAGCC GCTGCCAAC GGTCGGCCGC ACTCCGCTGA ACAACAATGC TCAAAACAC	60
GCCGTGACTC CACACACATC CCCTCGGCAC AGTAGGCGAT GTTGAGGAT CGGACGGCAC	120
GCGTGGCCGT CGGCGAGCGG TCGTGAACAA GTTGCATACA TATGAAAACC GTAAAAAGAT	180
TGAATTAA GCCGATCGTG TTCAATAGAG CCTAATAGAG AAGCGGGAGT GCGGCCTTG	240
GTAGGCAGGG GTCGAGTCGC GCGGTCAGGG GAAATGGCGC GGCGCGGGGC GGCGCGGGCG	300
GCAGCGCGCG GCGCGCGCGC GTCGCGCGC TGAC ATG GGC GGG CGG GCG CGC Met Gly Gly Arg Ala Arg	352
	775

CGC TCG CAC TTG GCG GCG CCC GCG GGC CTG CTG CTG CTG CTG TGC CTG Arg Ser His Leu Ala Ala Pro Ala Gly Leu Leu Leu Leu Cys Leu 780 785 790	400
CTC TGG CCG AGG GGG GCA CGC TGC GGG TAC CAC GAG AAG CGG CTA CTG Leu Trp Pro Arg Gly Ala Arg Cys Gly Tyr His Glu Lys Arg Leu Leu 795 800 805	448
CAC CAC CTA TTG GAC CAC TAC AAC GTA CTG GAG AGG CCC GTC GTC AAC His His Leu Leu Asp His Tyr Asn Val Leu Glu Arg Pro Val Val Asn 810 815 820	496
GAG AGC GAC CCG CTG CAG CTC TCC TTC GGC CTC ACG CTC ATG CAG ATC Glu Ser Asp Pro Leu Gln Leu Ser Phe Gly Leu Thr Leu Met Gln Ile 825 830 835 840	544
ATC GAC GTG GAC GAG AAG AAC CAG CTT TTA ATA ACA AAC ATC TGG CTA Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn Gln Leu Leu Ile Thr Asn Ile Trp Leu 845 850 855	592
AAA CTA GAG TGG AAT GAT ATG AAC TTG AGG TGG AAC ACT TCA GAT TTC Lys Leu Glu Trp Asn Asp Met Asn Leu Arg Trp Asn Thr Ser Asp Phe 860 865 870	640
GGC GGG GTC AAA GAT TTA AGA GTG CCA CCC CAC AGA CTA TGG AAA CCA Gly Gly Val Lys Asp Leu Arg Val Pro Pro His Arg Leu Trp Lys Pro 875 880 885	688
GAC GTC CTT ATG TAC AAC AGC GCG GAC GAA GGG TTC GAC AGC ACG TAT Asp Val Leu Met Tyr Asn Ser Ala Asp Glu Gly Phe Asp Ser Thr Tyr 890 895 900	736
CCA ACG AAC GTG GTG CGG AAC AAC GGC TCG TGT CTG TAC GTG CCG Pro Thr Asn Val Val Arg Asn Asn Gly Ser Cys Leu Tyr Val Pro 905 910 915 920	784
CCC GGC ATC TTC AAG AGC ACC TGC AAG ATC GAC ATC ACC TGG TTC CCC Pro Gly Ile Phe Lys Ser Thr Cys Lys Ile Asp Ile Thr Trp Phe Pro 925 930 935	832
TTC GAC GAC CAA CGA TGC GAG ATG AAG TTT GGC AGC TGG ACT TAT GAT Phe Asp Asp Gln Arg Cys Glu Met Lys Phe Gly Ser Trp Thr Tyr Asp 940 945 950	880
GGT TAT CAG TTG GAT CTA CAA CTA CAG GAT GAA GGG GGC GGA GAT ATA Gly Tyr Gln Leu Asp Leu Gln Leu Gln Asp Glu Gly Gly Asp Ile 955 960 965	928
AGC AGT TTT GTC ACG AAT GGC GAA TGG GAG TTA ATA GGA GTC CCC GGC Ser Ser Phe Val Thr Asn Gly Glu Trp Glu Leu Ile Gly Val Pro Gly 970 975 980	976
AAG CGC AAC GAG ATC TAC TAC AAC TGT TGT CCG GAG CCA TAC ATC GAC Lys Arg Asn Glu Ile Tyr Tyr Asn Cys Cys Pro Glu Pro Tyr Ile Asp 985 990 995 1000	1024
ATC ACG TTT GCG GTG GTG ATC CGG AGG AAA ACG CTC TAC TAC TTC TTC Ile Thr Phe Ala Val Val Ile Arg Arg Lys Thr Leu Tyr Tyr Phe Phe 1005 1010 1015	1072
AAT CTG ATC GTG CCC TGC GTG CTC ATC GCC TCC ATG GCT CTA TTG GGG Asn Leu Ile Val Pro Cys Val Leu Ile Ala Ser Met Ala Leu Leu Gly 1020 1025 1030	1120
TTC ACC TTG CCT CCA GAC TCC GGA GAA AAG TTG TCT TTA GGT GTG ACG Phe Thr Leu Pro Pro Asp Ser Gly Glu Lys Leu Ser Leu Gly Val Thr 1035 1040 1045	1168

ATA TTA CTG TCG TTG ACG GTG TTC CTC AAC ATG GTG GCG GAG ACG ATG Ile Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Leu Asn Met Val Ala Glu Thr Met 1050 1055 1060	1216
CCA GCG ACG TCG GAC GCC GTG CCC TTG CTC GGC ACC TAC TTC AAC TGC Pro Ala Thr Ser Asp Ala Val Pro Leu Leu Gly Thr Tyr Phe Asn Cys 1065 1070 1075 1080	1264
ATC ATG TTC ATG GTG GCT TCC TCC GTC GTC TCC ACC ATA CTG ATC CTC Ile Met Phe Met Val Ala Ser Ser Val Val Ser Thr Ile Leu Ile Leu 1085 1090 1095	1312
AAC TAC CAC CAC CGG CAC GCA GAC ACT CAC GAA ATG AGT GAT TGG ATT Asn Tyr His His Ala Asp Thr His Glu Met Ser Asp Trp Ile 1100 1105 1110	1360
.CGT TGC GTG TTC CTT TAT TGG CTG CCG TGG GTG CTG CGC ATG TCA CGG Arg Cys Val Phe Leu Tyr Trp Leu Pro Trp Val Leu Arg Met Ser Arg 1115 1120 1125	1408
CCC GGC TCG GCG ACG ACG CCG CCG CCG GCG CGC GTA CCT CCG CCG CCG Pro Gly Ser Ala Thr Thr Pro Pro Pro Ala Arg Val Pro Pro Pro Pro 1130 1135 1140	1456
GAC CTG GAG CTG CGC GAG CGC TCC TCC AAG TCG CTC CTA GCG AAC GTG Asp Leu Glu Leu Arg Glu Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Ala Asn Val 1145 1150 1155 1160	1504
CTC GAC ATC GAT GAC GAC TTC CGC CAC CCG CAA GCG CAG CAG CCG CAA Leu Asp Ile Asp Asp Asp Phe Arg His Pro Gln Ala Gln Gln Pro Gln 1165 1170 1175	1552
TGC TGC CGA TAC TAC AGG GGG GGT GAG GAG AAT GGC GCG GGG TTG GCG Cys Cys Arg Tyr Tyr Arg Gly Gly Glu Glu Asn Gly Ala Gly Leu Ala 1180 1185 1190	1600
GCG CAC AGT TGC TTC GGT GTC GAC TAC GAG CTC TCC CTC ATT CTG AAG Ala His Ser Cys Phe Gly Val Asp Tyr Glu Leu Ser Leu Ile Leu Lys 1195 1200 1205	1648
GAG ATT AGA GTC ATC ACA GAT CAG ATG CGC AAG GAC GAC GAA GAT GCG Glu Ile Arg Val Ile Thr Asp Gln Met Arg Lys Asp Asp Glu Asp Ala 1210 1215 1220	1696
GAC ATT TCG CGC GAC TGG AAG TTC GCC GCC ATG GTC GTG GAC AGA CTG Asp Ile Ser Arg Asp Trp Lys Phe Ala Ala Met Val Val Asp Arg Leu 1225 1230 1235 1240	1744
TGC CTT ATT ATC TTT ACC CTG TTC ACA ATC ATC GCC ACG CTA GCC GTG Cys Leu Ile Ile Phe Thr Leu Phe Thr Ile Ile Ala Thr Leu Ala Val 1245 1250 1255	1792
CTG CTG TCC GCG CCA CAC ATC ATG GTG TCG TAGCGACCCG CCCGCTTGCG Leu Leu Ser Ala Pro His Ile Met Val Ser 1260 1265	1842
GATACGCATG CGAAAAGTTC TGTGATACCG CGAATATTG TTAAGTTGTG ATGAGCGAAG TGGCGCGGAC GGTGACGCCG CGGCGTCGGA GTTGCCGCCG CCTGCCCTCGC CGCCCGCGCC CCCCCTGTAGA CATAAGTTAC CGCTGACTGC CAACCCGTGA CGTTCAACAA ATAACGTGCC ATCCGACTAA CGTCTTTAT CCCCTTGAAA AATTCAAGCGA TTGTGTACCC CTTTCTTCCA AGAATACAAT GACAAATGGT CGTCACGCC AGTGGAAATCA ATCCCGTACT CTTCGCCCGA TATTTCCCTT AGGGTATGTC ACGAGTTGA ATGAGCGGTT CCGTATCAGA CGTTCCGTCC 2202	1902 1962 2022 2082 2142

CCGGAACGGT	CGTCCCTGC	GATAAAGTGG	CACTACGTGC	TATACAGGCA	CTTAAGGCCG	2262
CCACGCCACG	GCGCCGCGGT	GCGCTCGGGC	CGCGAACCCG	CGACCCTCAC	CGCTGCAAGT	2322
GGCCACCCAC	TAGACAAGAC	TGCGGCAGAA	AATATTGCA	CAAAAACGTC	TTCCCTTCTTA	2382
CCGATGAACG	ACCTGATTG	CATTTAAAAT	TAAACTTGT	TAGAACTTCT	TCGATTCTTG	2442
AAATCTATTG	TACAGTTAG	AGTTGGGCG	GTGAAACAAT	GGCCCTTGT	TTCCCTTCTTG	2502
TTCGATTCCA	TGAATCGTGG	TTATAATCCC	TAGTTTATT	TTCGGATATA	TTTGTGTCAG	2562
TAGCTAGTAT	AGAACCTTAC	AAACAATGTT	GATTCAATTG	GTACAGGTTG	TGATATGCCT	2622
CGTTGTGAAC	GGGTCCGATA	TTGTTATAAA	TGGTAAAATA	CCCATGGCTA	TAGCTTAATA	2682
AATCGTTCGT	TAAAAGTTGT	AGTTAAACAA	ATATTATTTT	AATAAAGTCA	TATCTGGTC	2742
TTCCGGAACG	ACTTTTACAA	ATAATTAAAT	TACATATTAA	TATCACGTTT	GTACTTCTTT	2802
CCATACAGTT	ACAGTAATTG	GTATGCTGAA	AATAATATTA	GCTTGTAAAA	TTTCTTCTT	2862
CGAAAATTAA	TTCAAACAGA	TGCGACCATC	GTTCAAACA	TTTACATGTA	ATATAGAACT	2922
CATTTTATAA	GATATACAAC	ATTTTATAAG	TACAAGAAGT	TGTAACATGA	ACCGGTTTT	2982
CGTTACATAG	AGGGTATAAC	ACAAAGGTGC	CTACATATTG	ACAGATGCGA	AGCACGATCA	3042
GTTGATAAGC	ACAGGTACAC	TATATCCTGA	CATCCGACAG	TCCTGCCGCT	CGTCTGCCAC	3102
ACTCGGAAAC	ATTCGACAGT	TCAGTTTACT	GCTCCGCCAT	CATCGATTGT	TAAGTTGTT	3162
GTTCTAACTC	ATCGCATTCA	TTTCATTCAA	AAACATTGTA	AACCTCTCAA	GGGGAAAACG	3222
TGTTGTAAAC	AGTGAGAGTG	CGCGGGTACA	ACCGACACGC	GAATGTACCC	TCGCAAGGCT	3282
CCTGTAATGT	TTTCCTCTTC	CGAGGTGTTG	CTGAGAGTAA	TCTTAGACGG	TCCGATGGAA	3342
GTTGCGGACC	GGATATGATT	ACAAGTCAAT	GTTTTAAGT	CATCCGTTA	TTTATTGTTA	3402
TATCTTCTTA	CCATTGCTA	GAGGTTGTTG	GACGACCCGG	ACGGTGGCG	CCGCAACCCG	3462
CACACGCGGG	GTTCCATCTT	TGTATTAGAT	GGAAGTTGTG	CGGCATCTCT	CCGTCGGCAA	3522
TGGGACAACC	CGTTGTCCCC	ACATTTGTT	CAATTGTTAG	GGTTAACTCT	GAATTGCACT	3582
TTGTTTATTA	AATATAAACG	AATGAAACAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAACTCG	AGAGTACTTC	3642
TAGAGCGGCC	GCGGGCCAT	CGATTTCCA	CCCGGGTGGG	GTACCAGTAA	GTGTACCC	3700

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 496 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein  
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Gly Gly Arg Ala Arg Arg Ser His Leu Ala Ala Pro Ala Gly Leu  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Cys Leu Leu Trp Pro Arg Gly Ala Arg Cys Gly Tyr  
 20 25 30

His Glu Lys Arg Leu Leu His His Leu Leu Asp His Tyr Asn Val Leu  
 35 40 45

Glu Arg Pro Val Val Asn Glu Ser Asp Pro Leu Gln Leu Ser Phe Gly  
 50 55 60

Leu Thr Leu Met Gln Ile Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn Gln Leu Leu  
 65 70 75 80

Ile Thr Asn Ile Trp Leu Lys Leu Glu Trp Asn Asp Met Asn Leu Arg  
 85 90 95

Trp Asn Thr Ser Asp Phe Gly Gly Val Lys Asp Leu Arg Val Pro Pro  
 100 105 110

His Arg Leu Trp Lys Pro Asp Val Leu Met Tyr Asn Ser Ala Asp Glu  
 115 120 125

Gly Phe Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asn Val Val Val Arg Asn Asn Gly  
 130 135 140

Ser Cys Leu Tyr Val Pro Pro Gly Ile Phe Lys Ser Thr Cys Lys Ile  
 145 150 155 160

Asp Ile Thr Trp Phe Pro Phe Asp Asp Gln Arg Cys Glu Met Lys Phe  
 165 170 175

Gly Ser Trp Thr Tyr Asp Gly Tyr Gln Leu Asp Leu Gln Leu Gln Asp  
 180 185 190

Glu Gly Gly Asp Ile Ser Ser Phe Val Thr Asn Gly Glu Trp Glu  
 195 200 205

Leu Ile Gly Val Pro Gly Lys Arg Asn Glu Ile Tyr Tyr Asn Cys Cys  
 210 215 220

Pro Glu Pro Tyr Ile Asp Ile Thr Phe Ala Val Val Ile Arg Arg Lys  
 225 230 235 240

Thr Leu Tyr Tyr Phe Phe Asn Leu Ile Val Pro Cys Val Leu Ile Ala  
 245 250 255

Ser Met Ala Leu Leu Gly Phe Thr Leu Pro Pro Asp Ser Gly Glu Lys  
 260 265 270

Leu Ser Leu Gly Val Thr Ile Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Leu Asn  
 275 280 285

Met Val Ala Glu Thr Met Pro Ala Thr Ser Asp Ala Val Pro Leu Leu  
 290 295 300

Gly Thr Tyr Phe Asn Cys Ile Met Phe Met Val Ala Ser Ser Val Val  
 305 310 315 320

Ser Thr Ile Leu Ile Leu Asn Tyr His His Arg His Ala Asp Thr His  
 325 330 335

Glu Met Ser Asp Trp Ile Arg Cys Val Phe Leu Tyr Trp Leu Pro Trp  
 340 345 350

Val Leu Arg Met Ser Arg Pro Gly Ser Ala Thr Thr Pro Pro Pro Ala  
 355 360 365

Arg Val Pro Pro Pro Pro Asp Leu Glu Leu Arg Glu Arg Ser Ser Lys  
 370 375 380

Ser Leu Leu Ala Asn Val Leu Asp Ile Asp Asp Phe Arg His Pro

385	390	395	400
Gln Ala Gln Gln Pro Gln Cys Cys Arg Tyr Tyr Arg Gly Gly Glu Glu			
405	410	415	
Asn Gly Ala Gly Leu Ala Ala His Ser Cys Phe Gly Val Asp Tyr Glu			
420	425	430	
Leu Ser Leu Ile Leu Lys Glu Ile Arg Val Ile Thr Asp Gln Met Arg			
435	440	445	
Lys Asp Asp Glu Asp Ala Asp Ile Ser Arg Asp Trp Lys Phe Ala Ala			
450	455	460	
Met Val Val Asp Arg Leu Cys Leu Ile Ile Phe Thr Leu Phe Thr Ile			
465	470	475	480
Ile Ala Thr Leu Ala Val Leu Leu Ser Ala Pro His Ile Met Val Ser			
485	490	495	

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 3109 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Heliothis virescens
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
  - (B) CLON(E): Hva7-2
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
  - (B) LAGE: 95..1597

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GGCACGAGCC GGCGCACGT TGTCCCAGGC CGCATGAGCG CGCCGGCGTG CTAGCGCAGC	60
GTGCGCGGGT GTGGTATGCC CGCGCGTCGC CGCT ATG GCC CCT ATG TTG GCG	112
Met Ala Pro Met Leu Ala	
500	
GCC TTG GCG CTG CTG GCT TTG CTG CCC GTA TCG GAG CAA GGT CCT CAC	160
Ala Leu Ala Leu Ala Leu Leu Pro Val Ser Glu Gln Gly Pro His	
505	
510	
515	
GAG AAG AGA CTC CTG AAC GCG TTG CTG GCG AAC TAC AAC ACC CTG GAG	208
Glu Lys Arg Leu Leu Asn Ala Leu Leu Ala Asn Tyr Asn Thr Leu Glu	
520	
525	
530	
CGA CCG GTG GCC AAC GAG AGC GAA CCG CTA GAG GTC AGG TTC GGC TTG	256
Arg Pro Val Ala Asn Glu Ser Glu Pro Leu Glu Val Arg Phe Gly Leu	
535	
540	
545	
550	
ACC TTG CAG CAA ATC ATT GAC GTG GAC GAG AAG AAT CAA CTA CTT ATA	304

Thr Leu Gln Gln Ile Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn Gln Leu Leu Ile			
555	560	565	
ACC AAT ATA TGG CTG TCG TTG GAG TGG AAT GAC TAC AAC CTG AGG TGG			352
Thr Asn Ile Trp Leu Ser Leu Glu Trp Asn Asp Tyr Asn Leu Arg Trp			
570	575	580	
AAC GAC AGC GAG TAT GGC GGG GTC AAG GAC CTC AGG ATC ACG CCC AAC			400
Asn Asp Ser Glu Tyr Gly Gly Val Lys Asp Leu Arg Ile Thr Pro Asn			
585	590	595	
AAG TTG TGG AAG CCG GAC GTC CTT ATG TAT AAT AGT GCT GAC GAG GGT			448
Lys Leu Trp Lys Pro Asp Val Leu Met Tyr Asn Ser Ala Asp Glu Gly			
600	605	610	
TTT GAC GGG ACC TAC CAG ACC AAC GTG GTG GTC AGA AGC GGC GGC AGT			496
Phe Asp Gly Thr Tyr Gln Thr Asn Val Val Val Arg Ser Gly Gly Ser			
615	620	625	630
TGC CTG TAC GTG CCA CCT GGC ATA TTC AAG AGC ACA TGC AAG ATG GAC			544
Cys Leu Tyr Val Pro Pro Gly Ile Phe Lys Ser Thr Cys Lys Met Asp			
635	640	645	
ATC GCG TGG TTT CCC TTC GAC GAC CAA CAC TGT GAT ATG AAG TTC GGT			592
Ile Ala Trp Phe Pro Phe Asp Asp Gln His Cys Asp Met Lys Phe Gly			
650	655	660	
AGC TGG ACA TAT GAC GGC AAT CAG TTG GAT CTG GTG CTA AAA GAT GAG			640
Ser Trp Thr Tyr Asp Gly Asn Gln Leu Asp Leu Val Leu Lys Asp Glu			
665	670	675	
GCA GGC GGC GAT CTA TCG GAC TTC ATA ACA AAT GGG GAG TGG TAT CTA			688
Ala Gly Gly Asp Leu Ser Asp Phe Ile Thr Asn Gly Glu Trp Tyr Leu			
680	685	690	
ATA GGA ATG CCA GGC AAA AAG AAC ACA ATA ACA TAC GCG TGC TGC CCC			736
Ile Gly Met Pro Gly Lys Lys Asn Thr Ile Thr Tyr Ala Cys Cys Pro			
695	700	705	710
GAG CCC TAC GTG GAC GTC ACC TTC ACC ATC ATG ATA AGA AGA CGA ACC			784
Glu Pro Tyr Val Asp Val Thr Phe Thr Ile Met Ile Arg Arg Arg Thr			
715	720	725	
TTG TAC TAC TTC TTC AAC CTG ATC GTC CCG TGC GTG CTG ATC TCA TCG			832
Leu Tyr Tyr Phe Phe Asn Leu Ile Val Pro Cys Val Leu Ile Ser Ser			
730	735	740	
ATG GCA CTC CTC GGC TTC ACA CTG CCA CCA GAC TCC GGA GAG AAA CTC			880
Met Ala Leu Leu Gly Phe Thr Leu Pro Pro Asp Ser Gly Glu Lys Leu			
745	750	755	
ACA CTT GGA GTC ACT ATT CTT CTA TCG CTG ACG GTG TTC CTC AAC CTG			928
Thr Leu Gly Val Thr Ile Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Leu Asn Leu			
760	765	770	
GTA GCC GAG ACC CTG CCA CAG GTC TCC GAC GCT ATC CCC CTG TTA GGG			976
Val Ala Glu Thr Leu Pro Gln Val Ser Asp Ala Ile Pro Leu Leu Gly			
775	780	785	790
ACG TAC TTC AAT TGC ATC ATG TTC ATG GTA GCG TCG TCT GTG GTA CTG			1024
Thr Tyr Phe Asn Cys Ile Met Phe Met Val Ala Ser Ser Val Val Leu			
795	800	805	
ACT GTG GTG GTA CTC AAT TAC CAC CAT CGA ACA GCT GAT ATA CAT GAA			1072
Thr Val Val Val Leu Asn Tyr His His Arg Thr Ala Asp Ile His Glu			
810	815	820	

ATG CCA CAG TGG ATA AAA TCA GTA TTC CTA CAA TGG TTG CCA TGG ATA Met Pro Gln Trp Ile Lys Ser Val Phe Leu Gln Trp Leu Pro Trp Ile 825 830 835	1120
CTG CGA ATG TCG AGG CCA GGG AAG AAG ATC ACC AGG AAG ACT ATA ATG Leu Arg Met Ser Arg Pro Gly Lys Lys Ile Thr Arg Lys Thr Ile Met 840 845 850	1168
ATG AAC ACG AGG ATG AGG GAG CTG GAA CTG AAG GAG AGG TCG TCG AAG Met Asn Thr Arg Met Arg Glu Leu Glu Leu Lys Glu Arg Ser Ser Lys 855 860 865 870	1216
TCC TTG CTG GCG AAT GTT CTA GAT ATT GAT GAT GAC TTC AGA CAC GGC Ser Leu Ala Asn Val Leu Asp Ile Asp Asp Asp Phe Arg His Gly 875 880 885	1264
CCT CCG CCT AAC AGT ACT GCC TCG ACC GGG AAT TTG GGA CCT GGG Pro Pro Pro Asn Ser Thr Ala Ser Thr Gly Asn Leu Gly Pro Gly 890 895 900	1312
TGC TCA ATA TTC CGC ACG GAT TTC CGT CCG TCG TTC GTC CGT CCG TCC Cys Ser Ile Phe Arg Thr Asp Phe Arg Arg Ser Phe Val Arg Pro Ser 905 910 915	1360
ACG ATG GAA GAC GTG GGC GGC GGG CTG GGT AGC CAC CAT CGC GAG CTG Thr Met Glu Asp Val Gly Gly Leu Gly Ser His His Arg Glu Leu 920 925 930	1408
CAC CTC ATA CTG AGA GAG CTG CAG TTC ATC ACG GCC AGG ATG AAG AAG His Leu Ile Leu Arg Glu Leu Gln Phe Ile Thr Ala Arg Met Lys Lys 935 940 945 950	1456
GCT GAT GAG GAA GCC GAG CTG ATC AGC GAC TGG AAG TTT GCT GCG ATG Ala Asp Glu Glu Ala Glu Leu Ile Ser Asp Trp Lys Phe Ala Ala Met 955 960 965	1504
GTT GTT GAT AGG TTT TGC CTG TTC GTG TTC ACÀ CTT TTC ACA ATC ATC Val Val Asp Arg Phe Cys Leu Phe Val Phe Thr Leu Phe Thr Ile Ile 970 975 980	1552
GCG ACA GTA GCT GTC CTG TTA TCG GCA CCG CAT ATC ATC GTG CAA Ala Thr Val Ala Val Leu Leu Ser Ala Pro His Ile Ile Val Gln 985 990 995	1597
TGAACCAACC ACTGAGCCGG CAACTCCGGC GCATGAATGA GAGAAATAAT TATTAGATCG CCGATTGTA ATTATAATTG ATAATGTAAT TAAATTAAAT ACGTGGTTGA AACGCACACG	1657
TCTCCATAAC AAAGTCTTAA GACATTAAT TATGATAAAAT TTACATATTG TAGTTAACGTC	1717
GAGTGGTGT GGAAATTTA GCCGGCGCAA GGAGTTTCGT GAAGGTCTGT ATATATTTTT	1777
TCTTATTGTT GTATATTGTA TCGTTGTTCA TGTTTCTTT CAGGAAGTGA GCTTGTACT	1837
GTGATGGCAG GTGCACTTCA GTTCAGGCTG AAATTCAT TAACATTTAT	1897
TTAAACAAAT GTGATGTTGA CTAGGATGTT ATACAGATAA ATGTTGACGT GTATAATTG	1957
TTAAAATAAA CAATATTAAT TACTATTACT AAACGATATT ATAAACGAAG TACTAACGAG	2017
GGTTACTTTA ATGGGAAGAA CGCTAAGCTG GCACAGAGTT GCATTAATTG GAAAAAAGAA	2077
ATTACGGAAA AAAGTTTATT GAAAATTGAA CTTTTGGAA GGAAAGTAAC GTTGATCAA	2137
AAAAGTTGT AAAACGAAAG TTCGGTTCTG CGCCAATACT GGAATTAAAA TTCTCGTAAA	2197
TATTAGGGAA AAGAAGGTCC TTTAAAACAA AAGATTGAA CGGGCATCCT TTTTACAAGT	2257
	2317

AATGAGGGAT CACAGATGAT GACAAAAAAC CTTAGGGTAT ATAAGTAATG TACATAATGG	2377
ATCAAATATC GGTAGAGTCA AGAATAGTTA ACGATTAAAG ATTATTCAT TCGATATTAA	2437
AATTGATTG GCGATTGTCG CTGCGTCTAC TTTGATACAT ATCGATTGGA ATCGATATTG	2497
TATAAATTG GATAGATCGG ACATTAGTAA TGAGTATGGA CGTTTAATT TTAAAAAAAG	2557
AATGTAACAC GAAGATTAAA TCCAGGAATT GTTAAACAGT TATGGAATTG ATAAGAAATC	2617
AACAATTAAT ACGGAACCAA AGGTAGACTA GGTGTAGCAT CAGGAGATTG AATTAAAACA	2677
TAAATTAGGA CCGACTTAAA TGGAACTTGC GAGTGTATTG ATAACCTTTT AATTAAAAAA	2737
CTCATTGTCG ATTAAATGGA GAATAACTTT TGATCTCTCG TATCGATAAA TGCTCACTTA	2797
ACTATCGATA GCGTAATATT ATAACGTGTTA GTATATCGAT ATGGGAGTAA GTCACTAGCA	2857
TCAGAAATAG TCATTAATTA GGAATCGGTT TGTGTTAATG TTATGCTTAG CGAAAATATT	2917
ACAATGCTGT TGATATCACT AACCATCACG TAACCATATT GATAAAATGT AAATACAGAA	2977
TATTGCGGTG TGTATTTGTA TATAAATTAGG AGAAAAAAAG AAAAAGAAAG AACTCGAGAG	3037
TACTTCTAGA GCGGCCGCGG GCCCATCGAT TTTCCACCCG GGTGGGGTAC CAGGTAAGTG	3097
TACCCAATTC GC	3109

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 501 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Ala Pro Met Leu Ala Ala Leu Ala Leu Leu Ala Leu Leu Pro Val			
1	5	10	15

Ser Glu Gln Gly Pro His Glu Lys Arg Leu Leu Asn Ala Leu Leu Ala			
20	25	30	

Asn Tyr Asn Thr Leu Glu Arg Pro Val Ala Asn Glu Ser Glu Pro Leu			
35	40	45	

Glu Val Arg Phe Gly Leu Thr Leu Gln Gln Ile Ile Asp Val Asp Glu			
50	55	60	

Lys Asn Gln Leu Leu Ile Thr Asn Ile Trp Leu Ser Leu Glu Trp Asn			
65	70	75	80

Asp Tyr Asn Leu Arg Trp Asn Asp Ser Glu Tyr Gly Gly Val Lys Asp			
85	90	95	

Leu Arg Ile Thr Pro Asn Lys Leu Trp Lys Pro Asp Val Leu Met Tyr			
100	105	110	

Asn Ser Ala Asp Glu Gly Phe Asp Gly Thr Tyr Gln Thr Asn Val Val			
115	120	125	

Val Arg Ser Gly Gly Ser Cys Leu Tyr Val Pro Pro Gly Ile Phe Lys			
130	135	140	

Ser Thr Cys Lys Met Asp Ile Ala Trp Phe Pro Phe Asp Asp Gln His	
---	--

145	150	155	160
Cys Asp Met Lys Phe Gly Ser Trp Thr Tyr Asp Gly Asn Gln Leu Asp			
165	170	175	
Leu Val Leu Lys Asp Glu Ala Gly Gly Asp Leu Ser Asp Phe Ile Thr			
180	185	190	
Asn Gly Glu Trp Tyr Leu Ile Gly Met Pro Gly Lys Lys Asn Thr Ile			
195	200	205	
Thr Tyr Ala Cys Cys Pro Glu Pro Tyr Val Asp Val Thr Phe Thr Ile			
210	215	220	
Met Ile Arg Arg Arg Thr Leu Tyr Tyr Phe Phe Asn Leu Ile Val Pro			
225	230	235	240
Cys Val Leu Ile Ser Ser Met Ala Leu Leu Gly Phe Thr Leu Pro Pro			
245	250	255	
Asp Ser Gly Glu Lys Leu Thr Leu Gly Val Thr Ile Leu Leu Ser Leu			
260	265	270	
Thr Val Phe Leu Asn Leu Val Ala Glu Thr Leu Pro Gln Val Ser Asp			
275	280	285	
Ala Ile Pro Leu Leu Gly Thr Tyr Phe Asn Cys Ile Met Phe Met Val			
290	295	300	
Ala Ser Ser Val Val Leu Thr Val Val Val Leu Asn Tyr His His Arg			
305	310	315	320
Thr Ala Asp Ile His Glu Met Pro Gln Trp Ile Lys Ser Val Phe Leu			
325	330	335	
Gln Trp Leu Pro Trp Ile Leu Arg Met Ser Arg Pro Gly Lys Lys Ile			
340	345	350	
Thr Arg Lys Thr Ile Met Met Asn Thr Arg Met Arg Glu Leu Glu Leu			
355	360	365	
Lys Glu Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Ala Asn Val Leu Asp Ile Asp			
370	375	380	
Asp Asp Phe Arg His Gly Pro Pro Pro Asn Ser Thr Ala Ser Thr			
385	390	395	400
Gly Asn Leu Gly Pro Gly Cys Ser Ile Phe Arg Thr Asp Phe Arg Arg			
405	410	415	
Ser Phe Val Arg Pro Ser Thr Met Glu Asp Val Gly Gly Leu Gly			
420	425	430	
Ser His His Arg Glu Leu His Leu Ile Leu Arg Glu Leu Gln Phe Ile			
435	440	445	
Thr Ala Arg Met Lys Lys Ala Asp Glu Glu Ala Glu Leu Ile Ser Asp			
450	455	460	
Trp Lys Phe Ala Ala Met Val Val Asp Arg Phe Cys Leu Phe Val Phe			
465	470	475	480
Thr Leu Phe Thr Ile Ile Ala Thr Val Ala Val Leu Leu Ser Ala Pro			
485	490	495	
His Ile Ile Val Gln			
500			

5

**Patentansprüche**

1. Nukleinsäure umfassend eine Sequenz ausgewählt aus

10 (a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5,

(b) zumindest 14 Basenpaare langen Teilsequenzen der unter (a) definierten Sequenzen,

15

(c) Sequenzen, welche an die unter (a) definierten Sequenzen hybridisieren in 2 x SSC bei 60°C, bevorzugt in 0,5 x SSC bei 60°C, besonders bevorzugt in 0,2 x SSC bei 60°C,

20

(d) Sequenzen, welche eine zumindest 70%ige Identität zu den unter (a) definierten Sequenzen zwischen Position 1295 und Position 2195 aus SEQ ID NO: 1 oder zwischen Position 432 und Position 1318 aus SEQ ID NO: 3 oder zwischen Position 154 und Position 1123 aus SEQ ID NO: 5 aufweisen,

25

(e) Sequenzen, welche zu den unter (a) definierten Sequenzen komplementär sind und

30

(f) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneration des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz kodieren wie die unter (a) bis (d) definierten Sequenzen.

2. Vektor umfassend zumindest eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1.

35

5

3. Vektor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuremolekül funktionell mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, die die Expression der Nukleinsäure in pro- oder eukaryotischen Zellen gewährleisten.

10

4. Wirtszelle enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder einen Vektor gemäß Anspruch 2 oder 3.

5. Wirtszelle nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine pro- oder eukaryotische Zelle handelt.

15

6. Wirtszelle nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die prokaryotische Zelle E.coli ist.

20

7. Wirtszelle nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die eukaryotische Zelle eine Säuger- oder Insektenzelle ist.

8. Polypeptid, welches von einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 kodiert wird.

9. Acetylcholinrezeptor umfassend zumindest ein Polypeptid gemäß Anspruch  
25 8.

10. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß Anspruch 8 umfassend

30

- (a) das Kultivieren einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7 unter Bedingungen, die die Expression der Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 gewährleisten, und

- (b) die Gewinnung des Polypeptids aus der Zelle oder dem Kulturmedium.

35

5

11. Antikörper, welcher spezifisch mit dem Polypeptid gemäß Anspruch 8 oder dem Rezeptor gemäß Anspruch 9 reagiert.

12. Transgener Invertebrat enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1.

10

13. Transgener Invertebrat nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um Drosophila melanogaster oder Caenorhabditis elegans handelt.

14. Verfahren zur Herstellung eines transgenen Invertebraten gemäß Anspruch 12 oder 13 umfassend das Einbringen einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder eines Vektors gemäß Anspruch 2 oder 3.

15

15. Transgene Nachkommen eines Invertebraten gemäß Anspruch 12 oder 13.

20

16. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 umfassend die folgenden Schritte:

(a) Vollständige chemische Synthese auf an sich bekannte Weise oder

25

(b) chemische Synthese von Oligonukleotiden, Markieren der Oligonukleotide, Hybridisieren der Oligonukleotide an DNA einer Insekten-cDNA-Bank, Selektieren von positiven Klonen und Isolieren der hybridisierenden DNA aus positiven Klonen oder

30

(c) chemische Synthese von Oligonukleotiden und Amplifizierung der Ziel-DNA mittels PCR.

17. Regulatorische Region, welche natürlicherweise die Transkription einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 in Insektenzellen kontrolliert und eine spezifische Expression gewährleistet.

35

5

18. Verfahren zur Auffinden neuer Wirkstoffe für den Pflanzenschutz, insbesondere von Verbindungen, welche die Leitungseigenschaften von Rezeptoren gemäß Anspruch 9 verändern, umfassend die folgenden Schritte:

10

- (a) Bereitstellen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7,
- (b) Kultivieren der Wirtszelle in der Gegenwart einer Verbindung oder einer Probe, welche eine Vielzahl von Verbindungen umfaßt, und
- (c) Detektieren veränderter Leistungseigenschaften.

15

19. Verfahren zum Auffinden einer Verbindung, die an Rezeptoren gemäß Anspruch 9 binden, umfassend die folgenden Schritte:

20

- (a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7, eines Polypeptids gemäß Anspruch 8 oder eines Rezeptors gemäß Anspruch 9 mit einer Verbindung oder einem Gemisch von Verbindungen unter Bedingungen, die die Interaktion der Verbindung(en) mit der Wirtszelle, dem Polypeptid oder dem Rezeptor erlauben, und
- (b) Bestimmen der Verbindung(en), die spezifisch an die Rezeptoren binden.

25

20. Verfahren zum Auffinden von Verbindungen, die die Expression von Rezeptoren gemäß Anspruch 9 verändern, umfassend die folgenden Schritte:

30

- (a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7 oder eines transgenen Invertebraten gemäß Anspruch 11 oder 12 mit einer Verbindung oder einem Gemisch von Verbindungen,

35

5

- (b) Bestimmen der Rezeptorkonzentration, und
- (c) Bestimmen der Verbindung(en), die die Expression des Rezeptors spezifisch beeinflussen.

10

21. Verwendung zumindest einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1, eines Vektors gemäß Anspruch 2 oder 3, einer regulatorischen Region gemäß Anspruch 16 oder eines Antikörpers gemäß Anspruch 11 zum Auffinden neuer Wirkstoffe für den Pflanzenschutz oder zum Auffinden von Genen, die für Polypeptide kodieren, welche am Aufbau von funktionell ähnlichen Acetylcholinrezeptoren in Insekten beteiligt sind.

15

Figur 1

